

**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija**

**UČINAK EUTEKTIČNIH OTAPALA NA KULTURU  
MCF-7 STANICA**

**Lukrecija Vlahović**  
6852/BT

ZAVRŠNI RAD

**MODUL:** Biotehnologija 4

**MENTOR:** Doc. dr. sc. Kristina Radošević

**Zagreb, 2016**

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije,  
Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u  
Zagrebu pod vodstvom doc.dr.sc. Kristine Radošević.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Kristini Radošević na vodstvu, savjetima, prenesenom znanju, trudu, uloženom vremenu i pomoći u izradi ovog rada.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci tijekom školovanja.

## **DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**Završni rad**

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Zavod za biokemijsko inženjerstvo**

**Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije**

### **UČINAK EUTEKTIČNIH OTAPALA NA KULTURU MCF-7 STANICA**

**Lukrecija Vlahović, 6852/BT**

**Sažetak:.** Eutektična otapala su smjese akceptora i donora vodikove veze, a imaju temperaturu tališta mnogo nižu od temperature tališta pojedinačnih komponenata smjese. Zbog svojih jedinstvenih fizikalno-kemijskih svojstava, niske cijene i široke mogućnosti primjene eutektična otapala su u fokusu interesa posljednjih godina. Industrijska upotreba eutektičnih otapala može se očekivati u bližoj budućnosti obzirom na veliku mogućnost primjene u području zelenih tehnologija, no prije upotrebe u velikom mjerilu, njihov utjecaj na okoliš te biorazgradivost i toksičnost mora se detaljnije istražiti. U ovom radu ispitan je utjecaj osam eutektičnih otapala na preživljenje humane stanične linije MCF-7 primjenom kolorimetrijske MTS metode. Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da ispitana eutektična otapala nemaju inhibitoran učinak na rast MCF-7 stanica te posjeduju nisku citotoksičnost.

**Ključne riječi:** eutektična otapala, MCF-7 stanice, ekotoksikologija

**Rad sadrži:** 31 stranica, 11 slika, 1 tablicu, 59 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku (pdf format) pohranjen u:** Knjižnica

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** Doc.dr.sc. Kristina Radošević

**Rad predan:** lipanj, 2016.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Final Work**

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**Undergraduate study Biotechnology**

**Department of Bioengineering**

**Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformation**

### **THE EFFECT OF DEEP EUTECTIC SOLVENTS ON MCF-7 CELL LINE**

**Lukrecija Vlahović, 6852/BT**

**Abstract:** Deep eutectic solvents are mixtures of hydrogen bond acceptors and hydrogen bond donors with a melting point much lower than that of either of its components. They have been in the focus of interest in the last years due to their unique properties, low cost and wide range of applications. Their industrial usage can be expected in the future based on numerous potential DESs applications in the green technologies, therefore environmental impact and fate of DESs has to be investigated in more details. In this final work the impact of eight DESs on human cell line MCF-7 was tested by MTS method. Based on the results, we can conclude that these DESs have no inhibitory effect on MCF-7 cells and therefore possess low cytotoxicity.

**Keywords:** deep eutectic solvents, MCF-7 cells, ecotoxicology

**Thesis contains:** 31 pages, 12 figures, 1 table, 53 references

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic (pdf format) version deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** Ph.D. Kristina Radošević, Assistant professor

**Thesis delivered:** June, 2016

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	2
2.1. Eutektička otapala	2
2.1.1. Tipovi eutektičnih otapala	3
2.1.2. Prirodna eutektična otapala	3
2.1.3. Svojstva eutektičnih otapala	4
2.1.4. Primjena eutektičnih otapala	5
2.2. Ekotoksikologija	7
2.2.1. <i>In vitro</i> ispitivanja u ekotoksikologiji primjenom kultura stanica	9
2.2.2. Ekotoksikološki profil eutektičnih otapala	10
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	12
3.1. Materijali	12
3.1.1. Kemikalije	12
3.1.2. Otopine i puferi	12
3.1.3. Uređaji i oprema	13
3.1.4. Humana stanična linija	13
3.1.5. Eutektična otapala	14
3.2. Metode	15
3.2.1. Uzgoj MCF-7 stanica	15
3.2.2. Određivanje broja stanica dodatkom boje tripan-plavo	15
3.2.3. Nacjepljivanje i tretman MCF-7 stanica	16
3.2.4. MTS metoda za određivanje preživljenja stanica	17
3.2.5. Bojanje stanica otopinom boje kristal ljubičasto	18
<b>4. REZULTATI</b>	19
4.1. Utjecaj eutektičnih otapala na MCF-7 staničnu liniju	19
4.1.1. Učinak eutektičnih otapala baziranih na kolin kloridu kao kationu	19
4.1.2. Učinak eutektičnih otapala s organskim kiselinama kao HDB-ima	20
4.1.3. Učinak eutektičnih otapala koja sadrže beatin	21
4.2. Morfologija MCF-7 stanica tretiranih eutektičnim otapalima	22
<b>5. RASPRAVA</b>	23
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	26
<b>7. LITERATURA</b>	27

## **1. UVOD**

Eutektična otapala su smjese akceptora i donora vodikove veze koje imaju temperaturu tališta mnogo nižu od temperature tališta individualnih komponenata smjese. Posljednjih godina eutektična otapala su često područje brojnih znanstvenih istraživanja radi njihovih jedinstvenih svojstava, niske cijene i mogućnosti široke primjene.

Eutektična otapala poznata su već duže vrijeme i primjenjuju se pri lemljenju (upotrebljavaju se eutektične smjese kositra i olova za lemljenje električnih spojeva), uklanjanju leda (natrijev klorid i voda) i u lijekovima (lidokain/prilokain). Danas je u porastu interes za eutektičnim otapalima kao alternative organskim otapalima koja se koriste u mnogim tehnološkim procesima, a imaju nepovoljna svojstva za okoliš i ljude. Posljednja dva desetljeća kao alternativna otapala najviše su istraživane ionske kapljevine, no mnoga istraživanja pokazala su da ionske kapljevine nisu istinski zelene, kao što se pretpostavljalo, naprotiv mnoge od njih su toksične, slabo biorazgradive i uz to skupe. Potraga za biorazgradivim i nisko toksičnim otapalima se nastavila i rezultirala istraživanjima eutektičnih otapala. U Europi, REACH zakonodavstvo potiče znatnija ulaganja u tom području, očekujući ekonomsku kompetitivnost zelenih otapala u odnosu na ona dobivena iz neobnovljivih izvora.. Zbog prisutnosti u prirodi, obnovljivosti, niske toksičnosti i biorazgradivosti sastavnih komponenata eutektičnih otapala pretpostavlja se da ove smjese mogu biti puno zelenije i da ih je lakše registrirati od ionskih kapljevina. Uz to eutektična otapala su jeftinija i lakše se sintetiziraju. Zbog spomenute netoksičnosti i biorazgradivosti prirodnih spojeva koji se koriste kao ishodne tvari za sintezu eutektičnih otapala, ona su izuzeta su od registracije prema REACH propisima, no dosadašnja znanstvena istraživanja su pokazala da pri tome može biti zanemaren mogući sinergistički efekt, odnosno da toksičnost smjese može biti puno viša od toksičnosti individualnih komponenata. Stoga toksičnost eutektičnih otapala mora biti testirana prije značajnije primjene u industrijskom mjerilu te je upravo ekotoksikološki profil eutektičnih otapala predmet istraživanja znanstvenika posljednjih godina..

U ispitivanju toksičnosti kemikalija i uzoraka iz okoliša često se koriste *in vitro* metode te se primjenjuju kulture stanica kao alternativa *in vivo* ispitivanjima na pokusnim životinjama. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati citotoksičnost osam eutektičnih otapala na humanoj staničnoj liniji MCF-7 primjenom MTS kolorimetrijske metode.

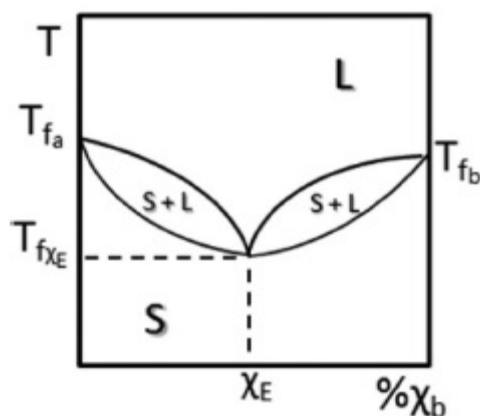


## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Eutektička otapala

Kreiranje otapala koja nisu štetna za okoliš zauzima važno mjesto u okviru zelenih tehnologija (Anastas i Warner, 1998; Anastas i Eghbali, 2010; EEA 2013). U posljednjih dvadesetak godina, ionske kapljevine privlače veliku pozornost kao nova generacija zelenih otapala sa potencijalnom upotrebom u raznim industrijskim granama (Petković i sur., 2011). Međutim, unatoč brojnim zelenim osobinama ionskih kapljevine (nehlapljivost, nezapaljivost, mogućnost višestruke upotrebe), nedostaci konvencionalnih ionskih kapljevine, poput imidazolijevih i pirdinijevih, su visoka cijena, toksičnost im je jednaka, ili čak veća od toksičnosti organskih otapala, a biorazgradivost im je relativno niska (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). To je potaknulo znanstvenike na razvoj otapala koja će zadržati odlična tehnološka svojstva ionskih kapljevine, ali biti će jeftinija i imati povoljniji utjecaj na okoliš, što je dovelo do razvoja eutektičnih otapala (eng. *deep eutectic solvents* – DESs) (Carriazo i sur., 2012; Ruß i Köning, 2012; Zhang i sur., 2012; Francisco i sur., 2013).

Eutektična otapala sastoje se od dvije ili više komponenata koje stvaraju eutektičnu smjesu čija je temperatura tališta niža od temperature tališta komponenata zasebno (Slika 1), što je rezultat unutarmolekularnih vodikovih veza. Primjer jednostavnog eutektičnog otapala je smjesa dvije krutine, uree ( $T_v = 133\text{ °C}$ ) i kolin klorida ( $T_v = 302\text{ °C}$ ) u molarnom omjeru 2:1, koja rezultira tekućinom ( $T_v = 15\text{ °C}$ ) (Galuszka i sur., 2013). Kolin klorid je kvarterna amonijeva sol – nije opasna, jeftina je i netoksična. Često je sastavni dio eutektičnih otapala i obično se kombinira s tvarima koje mogu stvarati vodikove veze (npr. amidima, kiselinama i alkoholima).



**Slika 1.** Fazni dijagram za zamišljenu binarnu eutektičnu smjesu (dvije komponente su označene s  $a$  i  $b$ ,  $T$  – temperatura tališta) (Paiva i sur., 2014)

### 2.1.1. Tipovi eutektičnih otapala

Tvari od kojih se pripremaju DES-ovi su najčešće lako dostupne, jeftine, sigurne, neotrovne i biorazgradive te su sklone samoudruživanju uslijed nastalih nekovalentnih interakcija, najčešće vodikovih veza. Postoje četiri različite vrste eutektičnih smjesa (Abbot i sur., 2007):

Tip 1. metalna sol + organska sol (npr.  $\text{ZnCl}_2$  + kolin klorid)

Tip 2. hidrat metalne soli + organska sol (npr.  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  + kolin klorid)

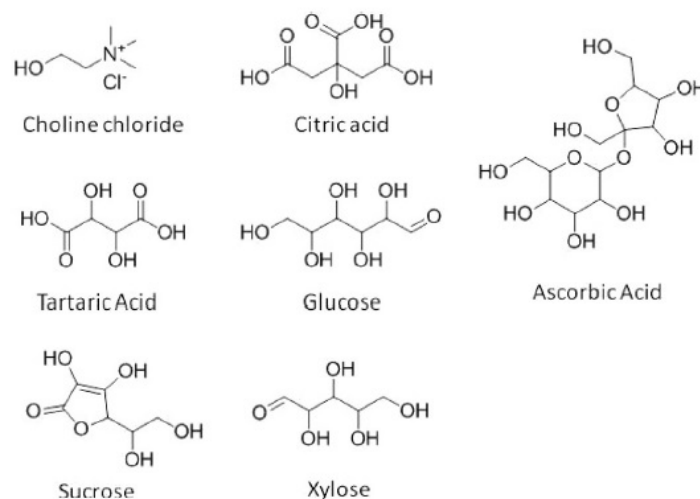
Tip 3. organska sol + donor vodikove (npr. kolin klorid + urea)

Tip 4. metalni klorid + donor vodikove veze (npr.  $\text{ZnCl}_2$  + urea/etilen glikol/acetamid)

Tipične komponente otapala koje su donori vodikovih veza su karboksilne kiseline, amidi, alkoholi i ugljikohidrati. S tehnološkog gledišta, smjese kolin klorida i tvari koje su donori vodikovih veza vrlo su važne, jer DES-ovi na bazi kolin klorida imaju dobra fizička i kemijska svojstva slična onima ionskih kapljevina, koja su toksičnija, no češća u upotrebi (Abbot i sur., 2006).

### 2.1.2. Prirodna eutektična otapala

Prirodna eutektična otapala (eng. *natural deep eutectic solvents* – NADESs) sastoje se od primarnih metabolita poput aminokiselina, organskih kiselina, ugljikohidrata, derivata kolina i uree. Primjeri različitih molekula koje mogu tvoriti prirodna eutektična otapala prikazani su na slici 2. Ova otapala pružaju velike mogućnosti zbog svoje široke kemijske raznolikosti, biorazgradivosti i niske toksičnosti što im dozvoljava primjenu u farmaceutskoj industriji. Pretpostavka je da se takva otapala nalaze u tkivima živih organizama kao „treći medij“ u stanicama čime se objašnjava tako veliki broj kemijskih reakcija u stanicama (Kudlak i sur., 2015).



**Slika 2.** Kemijska struktura različitih komponenata koje mogu biti dio prirodnih eutektičnih otapala (Paiva i sur., 2014).

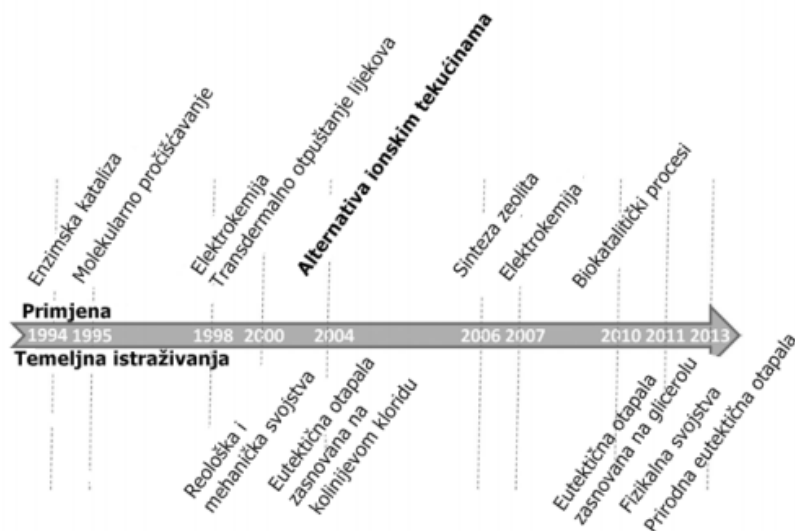
### 2.1.3. Svojstva eutektičnih otapala

Eutektična otapala dijele nekoliko zanimljivih karakteristika s ionskim kapljevinama, a to su: niska temperatura tališta, niska hlapivost, visoka toplinska stabilnost i visoka topljivost (Zhao i sur., 2013). Zbog tih sličnosti neki autori smatraju eutektična otapala četvrtom generacijom ionskih kapljevin (Dominguez de Maria i sur., 2011), no to nije u potpunosti točno budući DES-ovi nisu sastavljeni od iona. U usporedbi s ionskim kapljevinama, eutektična otapala su jeftinija, bolje biorazgradiva i sastoje se od tvari koje nisu štetne za okoliš te se smatraju učinkovitijima za određene primjene (del Monte i sur., 2014). Uz sve navedeno, priprava DES-ova je jednostavnija i brža pri čemu se dobiju otapala visoke čistoće.

Fizička svojstva eutektičnih otapala uvelike ovise o tvarima od kojih su pripravljena, obzirom na njihove kemijske osobine i sadržaj vode (Singh i sur., 2013). Budući su DES-ovi smjese netoksičnih tvari, pretpostavlja se da će i njihove smjese, odnosno nastali DES-ovi biti netoksični, no u radu Hayyana i sur. (2013a, 2013b) ukazano je da je zbog sinergističkog učinka moguće da toksičnost smjese bude veća nego toksičnost pojedinačnih komponenti. Stoga svako novo sintetizirano otapalo treba pomno ispitati, njegovu toksičnost i biorazgradivost.

#### 2.1.4. Primjena eutektičnih otapala

Razvoj primjene eutektičnih otapala započeo je u devedesetim godinama prošlog stoljeća (Paiva i sur., 2014). Kratak povijesni pregled otkrića osnovnih svojstava eutektičnih otapala i razvoja njihove primjene prikazan je na slici 3.



**Slika 3.** Vremenska crta otkrivanja osnovnih svojstava eutektičnih otapala i razvoja njihove primjene (Paiva i sur., 2014).

1994. godine eutektična otapala predstavljena su kao medij za enzimске reakcije. Dokazano je da enzimi otopljeni u eutektičnim otapalima zadržavaju svoju aktivnost, te da DES-ovi predstavljaju bolji reakcijski sustav u usporedbi s konvencionalnim organskim otapalima (Gill i sur., 1994).

1995. godine otkrivena je mogućnost upotrebe eutektičnih smjesa kao alternativnog medija u emulzijskoj kristalizaciji koji omogućava ekonomičniji način separacije i pročišćavanja molekularnih smjesa (Davey i sur., 1995).

1998. godine prvi put je istražena mogućnost ciljanog oslobađanja transdermalnih lijekova. Smjesa farmakološki aktivnih komponenti i različitih terpena kao pojačivača propusnosti kože detaljno je analizirana. Mogućnost sparivanja aktivnih komponenti sa sekundarnim komponentama i pripreme bioaktivne eutektične smjese otvara širok spektar budućeg razvoja farmaceutika i njihove biomedicinske primjene (Stott i sur., 1998).

Prvi nagovještaj mogućnosti da se eutektična otapala koriste kao svestrana alternativa ionskim kapljevina, odnosno organskim otapalima, bio je 2004. godine radom Abbot i sur. (2004). U tom radu usvojen je naziv eutektičnih otapala pri opisivanju velikog pada temperature taljenja smjese kolin klorida i uree. To svojstvo eutektičnosti posljedica je vodikovih veza koje se stvaraju između uree i kolin klorida. Dokazano je da su ponašanja faza i fizička svojstva eutektičnih otapala slična onima ionskih kapljevina, a ovise o broju kiselinskih skupina, aril/alkilnih skupina i sastavu smjese. Tada su pokrenuta brojna istraživanja fizikalno-kemijskih karakteristika i termodinamike eutektičnih smjesa čije poznavanje je temeljna točka za razvoj raznolikih primjena eutektičnih otapala (Paiva i sur., 2014).

Upotreba DES-ova u proizvodnji zeolita istovremeno i kao otapala i kao organskog predloška potrebnog u reakcijama sinteze opisana je u nekoliko radova na primjeru pripreme zeolita aluminij-, cirkonij- i cink fosfata (Liu i sur., 2009; Drylie i sur., 2007).

Mogućnost primjene DES-ova u području elektrokemije rezultat je ispitivanja DES-ova na bazi kolina cikličkom voltametrijom i amperometrijom (Nkuku i LeSuer, 2007). Dodatna pogodnost DES-ova za to područje primjene je visoka topljivost metalnih soli u nevodenim medijima te visoka vodljivost samih eutektičnih otapala (Haerens i sur., 2009).

Djelotvornost otapala korištenih za ekstrakciju raznih tvari iz smjesa ovisi o sposobnosti otapanja ciljne molekule u otapalu. DES-ovi mogu donirati i prihvatiti protone i elektrone te stvaraju vodikove veze čime se povećava njihova sposobnost otapanja raznih tvari (Zhang i sur., 2012). Obzirom na navedeno krenulo se s primjenom DES-ova u procesima ekstrakcije ugljikohidrata iz kemijskih smjesa (Zdanowicz i sur., 2011), dok su prirodna eutektična otapala pokazala visoku učinkovitost u ekstrakciji fenolnih spojeva (Dai i sur., 2013). Bioaktivne molekule, poput benzojeve kiseline, često nisu topive u vodi, no u DES-ovima je njihova topljivost i do nekoliko tisuća puta veća, što čini eutektična otapala prikladnim medijima za njihovu ekstrakciju (Morrison i sur., 2009). Zbog svoje niske toksičnosti DES-ovi se koriste u ekstrakcijama prirodnih spojeva za farmaceutsku upotrebu (Paiva i sur., 2014), a također je poznata njihova sposobnost otapanja iona prijelaznih metalnih oksida iz minerala.

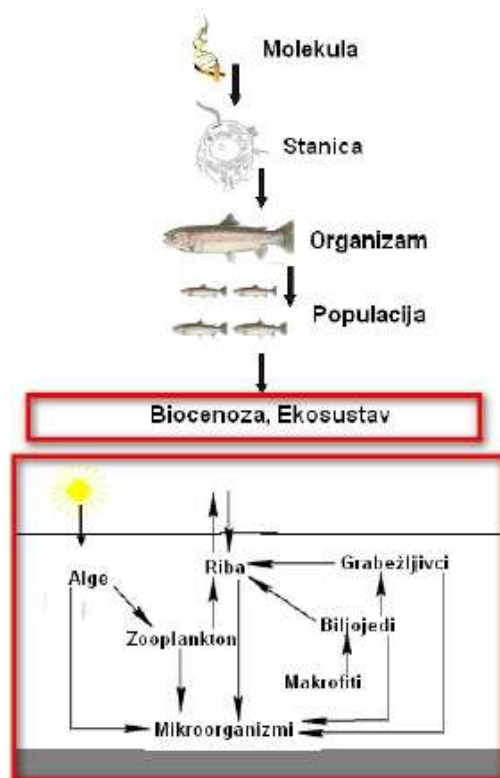
Novija istraživanja upućuju na svojstvo eutektičnih otapala da kao medij održavaju živima razne organizme, poput bakterija u nevodenom mediju (Gutierrez i sur., 2010). Postoji

velik broj znanstvenih radova koji istražuju ovu mogućnost zbog potrebe za unaprjeđenjem imobilizacije raznih biokatalizatora te kao mogućnost njihove stabilizacije i reciklacije čime bi se smanjili troškove procesa (Paiva i sur., 2014). S druge strane, u literaturi je opisana i toksičnost određenih DES-ova prema bakterijama (Hayyan et al., 2013b) što upućuje na mogućnost primjene tih otapala kao antimikrobnih sredstava. Antimikrobno djelovanje DES-ova pripisuje se promjenama na membrani stanice zbog prisutnosti delokaliziranih naboja (Paiva i sur., 2014).

Uz sve navedene mogućnosti primjene DES-ova istražuje se njihova upotreba u proizvodnji biodizela (Hayan i sur., 2013) te apsorpciji ugljikovog dioksida (Ali i sur., 2014). Iako su brojni primjeri primjene eutektičnih otapala ona su i nadalje poprilična novost u domeni alternativnih otapala i njihova primjena zaostaje za primjenom ionskih kapljevin (Radošević i sur., 2016) te se smatra da će neograničene mogućnosti upotrebe eutektičnih otapala tek biti istražene i otkrivene (Francisco i sur., 2013, Zhang i sur., 2012).

## 2.2. Ekotoksikologija

Ekotoksikologija se kao područje znanosti intenzivno razvila u posljednja tri desetljeća kao prirodna znanost, koja se temelji na toksikologiji s jedne strane, te primijenjene ekologije i zelene kemije s druge strane. Ekotoksikologija se bavi interakcijama između okolišnih kemikalija i biota, fokusirajući se na štetne učinke na različitim biološkim razinama, od molekula, preko stanica, tkiva, organa i organizama, pa sve do populacija i ekoloških sustava, kao što je prikazano na slici 4. Toksično djelovanje antropogenih kemikalija u biotima i ekosustavima istražuje se u bliskoj ovisnosti s kemijom okoliša i sudbinom kemikalija uključujući njihovu bioraspoloživost, koja ovisi o biogeokemijskim procesima. Dok je praktična primjena ekotoksikologije uglavnom usmjerena na regulatorna pitanja (registracija kemikalija) i na taj način na testiranje kemikalija standardiziranim i zakonom propisanim testovima, fokus znanstvenih ekotoksikoloških istraživanja puno je širi. Ekotoksikološka istraživanja usmjerena su na razumijevanje toksikoloških fenomena u različitim biotima, populacijama i ekosistemima te razmatranje različitih aspekata poput mehanizama toksičnog djelovanja i ekoloških procesa u kontaminiranim sustavima (Fent, 1998).



Slika 4. Ekotoksikologija – znanost okoliša koja izučava djelovanje tvari iz okoliša na različitim biološkim razinama (Fent, 2001).

Ekotoksikološka istraživanja mogu se usmjeriti na ekološke i toksikološke posljedice promatrane unutar retrospektivnih studija, pri čemu se analizira uzročna povezanost između uočenih posljedica i kemijskih ostataka tvari prisutnih u okolišu, što je često teško utvrditi. Integrirani pristup, koji uzima u obzir okolišne kemijske, ekološke i toksikološke čimbenike, prikladan je za razumijevanje ekotoksikoloških posljedica u zagađenim ekosistemima (Fent, 1996). Primjer ekotoksikološke strategije za procjenu zagađenja i njegovih potencijalnih posljedica je upotreba biomarkera u ekološkim istraživanjima kako bi odredili bioraspoloživost i prisutnost zagađivača u biotima (Bucheli i Fent, 1996). Izbor odgovarajućih biomarkera omogućava veliku sposobnost razlikovanja između grupa zagađivača (Fent, 2001). Drugi, perspektivniji pristup baziran je na istraživanju potencijalnih toksikoloških učinaka raznim laboratorijskim testovima, *in vitro* i *in vivo*, koji se mogu ekstrapolirati i povezati sa zapaženim promjenama na terenu (Fent, 2001).

Procjena rizika u ekotoksikologiji većinom se bazira na predviđanjima temeljenim na istraživanjima na jednoj vrsti laboratorijskih životinja. Taj princip proizlazi iz ideje da šteta



načinjena u ekosustavu nastaje na razini jedinke. Utvrđeno je da se odziv ekosistema općenito može pripisati promjenama u fiziologiji, biokemiji i drugih parametara na razini stanice. Ako su pojedinačne vrste otporne i sam ekosustav će biti održiv (Wiess, 1985). No s druge strane, različite vrste mogu se razlikovati po osjetljivosti na različite toksine te neke ekološki srodne vrste mogu imati različitu izloženost toksinima uslijed razlike u ponašanju, sklonosti prema određenoj hrani i fazi života (Chapman, 1981) stoga nije moguće znati koji je ključni faktor osjetljivosti (Cairns 1986; Cairns i Niederlehner, 1987). *In vivo* testiranja zahtjevnija su, vremenski dugotrajna, skupa i neetična te se iz navedenih razloga nastoji naći barem djelomična zamjena za pokuse na laboratorijskim životinjama (Isomaa i Lillius, 1995) te se kao alternativa često koriste kulture stanica kao *in vitro* modelni sustavi.

### 2.2.1. *In vitro* ispitivanja u ekotoksikologiji primjenom kultura stanica

U ekotoksikološkim istraživanjima, *in vitro* ispitivanja u kulturama stanica važna su kao i ispitivanja s laboratorijskim životinjama (*in vivo*), jer se primarna interakcija između biota i kemikalija događa upravo na površini stanica. Hoće li kemijski inducirane promjene u staničnoj strukturi i fiziologiji izazvati štetne, toksične posljedice na pojedinačnu stanicu, a potom na organizam u cijelini, ovisi o brojnim parametrima. Učinci kemikalija na stanice često, no ne i nužno, određuju štetan utjecaj visokih koncentracija tih kemikalija u biološkim sustavima. Faktori poput kompenzacijskih mehanizama i prisutnost drugih čimbenika mogu utjecati na relevantnost staničnih toksikoloških odziva na ukupni ekotoksikološki efekt za određenu kemikaliju. Očigledna je pretpostavka da bi stanične promjene mogle znatno utjecati na biološke parametre bitne za populaciju poput rasta, razvoja, zdravlja i reprodukcije. Stoga su toksikološka istraživanja u kulturi stanica dobar način razumijevanja ekotoksikoloških procesa, s obzirom da igraju važnu ulogu u objašnjavanju toksičnog djelovanja i procjeni mogućeg toksikološkog učinka ispitivane tvari. Iako u biološkim *in vitro* testovima u kulturama stanica nisu uzeti u obzir procesi koji se odvijaju u ekosistemu i zanemaren je utjecaj okolišnih faktora na toksičnost, *in vitro* ispitivanja bitna su u karakterizaciji toksičnog djelovanja kemikalija i razumijevanju mehanizma toksičnosti. No prije konačnog zaključka o djelovanju neke tvari prisutne u okolišu svakako su potrebna dodatna i opsežnija *in vivo* istraživanja ekoloških i toksikoloških procesa u zagađenim sistemima (Fent, 2001).

Kod provođenja *in vitro* testova toksičnosti najčešće se određuje bazalna citotoksičnost koja se definira kao učinak nastao međudjelovanjem ispitivane tvari i/ili procesa neophodnih za preživljavanje, proliferaciju ili funkcije zajedničke svim stanicama u organizmu (Ekwal, 1995). Razvijeni su brojni testovi koji se primjenjuju za praćenje citotoksičnosti: neutral red (NR) test, testovi redukcije tetrazolijeve soli (MTT, MTS, WST - 1), otpuštanje laktat dehidrogenaze (LDH), bojanje bojom kristal ljubičasto, smanjenje razine ATP-a i test proliferacije stanica.

Osnovni cilj ispitivanja citotoksičnosti *in vitro* je osmisлити eksperiment koji će se moći jednostavno izvoditi, a da pri tome daje reprezentativne rezultate. Citotoksični odgovor između različitih staničnih linija može znatno varirati što ovisi o: metaboličkoj aktivnosti stanica, o sastavu medija za uzgoj, temperaturi inkubacije, vremenu izlaganja i drugim faktorima (Fent, 2007). U toksikološkim istraživanjima već dugo se koriste kontinuirane stanične linije sisavaca i riba, kao sredstva za procjenu toksičnosti antropogenih kemikalija, smjesa spojeva i okolišnih uzoraka (Fent, 2001). Prema nekim autorima, stanice sisavaca koje se uzgajaju na višoj temperaturi nego stanice riba i često proliferiraju brže od ribljih kultura, su osjetljivije na učinak raznih kemikalija i iz tog razloga daju rezultate koji bolje predviđaju *in vivo* utjecaj kemikalija (Castaño i sur., 2003; Segner, 2004).

Primjenom staničnih linija osigurana je gotovo neograničena zaliha stanica sa sličnim genotipom i fenotipom. Njihovom upotrebom izbjegavamo varijacije između individualnih jedinki i zaobilazimo etičke probleme povezane sa istraživanjima koja se vrše na životinjama ili ljudima.

#### 2.2.2. Ekotoksikološki profil eutektičnih otapala

Industrijska upotreba eutektičnih otapala može se očekivati s obzirom na mogućnost široke primjene u području zelenih tehnologija. No prije upotrebe u velikom mjerilu, njihov utjecaj na okoliš te biorazgradivost i toksičnost mora se opsežno i kritično procijeniti (Tannenberger, 2010). Većina dosad objavljenih radova daje toksikološku analizu komponenata eutektičnih otapala, koje su izvedene iz biomaterijala i farmaceutski su prihvatljive. Međutim, ta teorija ne uzima u obzir sinergistički efekt kombinacije komponenata u eutektičnim otapalima (Hayyan i sur., 2013a) koja ima značajan utjecaj na

biološka svojstva otapala. U nekoliko dosad objavljenih radova (Hayyan i sur., 2013a, 2013b; Paiva i sur., 2014) procijenjena je toksičnost nekoliko eutektičnih otapala baziranih na kolin kloridu i fosfoniju na račićima i bakterijama. Dokazano je da su eutektična otapala bazirana na kolin kloridu potpuno bezopasna za testirane bakterije dok ona bazirana na fosfoniju imaju neznatno antibakterijsko djelovanje. Toksičnost individualnih komponenti ispitanih eutektičnih otapala znatno je manja od toksičnosti samog otapala, što indicira postojanje sinergističkog efekta. Paiva i sur. (2014) prvi su testirali djelovanje 11 različitih DES-ova na L929 stanicama fibroblasta i usporedili ih sa djelovanjem ionskih kapljevina. Dobiveni rezultati ne pokazuju jasnu povezanost između citotoksičnog učinka i sastava otapala pa je nužno i nadalje ispitivati toksičnost DES-ova na raznim modelnim sustavima. Uz to nužno je odrediti potencijal biorazgradivosti eutektičnih otapala prije njihove upotrebe u velikom mjerilu (Radošević i sur., 2015).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- 0,25 % Trypsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- Tripin-plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kristal-ljubičasto, Kemika, Zagreb, RH
- CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI, SAD
- Etanol, p.a., Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev hidroksid, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Eutektna otopala: kolin klorid:ksilitol (Ch:Xyl), kolin klorid:sorbitol (Ch:Sol), limunska kiselina:prolin (Cit:Pro), limunska kiselina:glukoza (Cit:Glc), jabučna kiselina:glukoza (Ma:Glc), beatin:glukoza (B:Glc), beatin:jabučna kiselina:glukoza (B:Ma:Glc) i beatin:jabučna:prolin (B:Ma:Pro) pripravljena u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF, Zagreb, RH

#### 3.1.2. Otopine i puferi

- PBS pufer (pH=7,4)

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
Destilirana voda	do 1000 mL

- 0,4 % otopina tripan-plavo
 

boja tripan-plavo	0,04 g
PBS pufer	do 10 mL
- 0,2 % otopina kristal-ljubičasto
 

boja kristal-ljubičasto	0,02 g
2 % etanol	do 10 mL

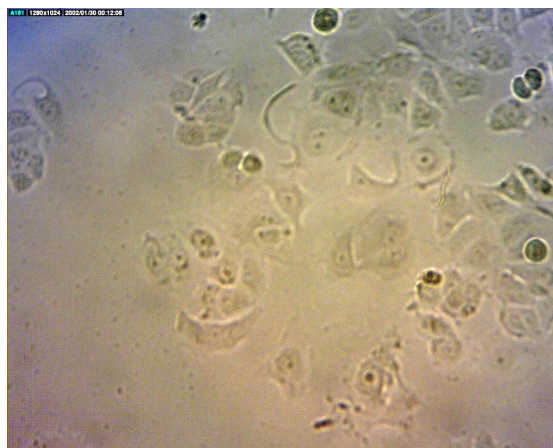
### 3.1.3. Uređaji i oprema

- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO<sub>2</sub>, Kambič, Slovenija
- Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Dyno-Eye digital camera, ANMO Electronics Corporation, Tajvan
- T-boce od 25 cm<sup>2</sup>, Corning, SAD
- Ploče s 96 jažica, Corning, SAD
- Čitač ploča, Tecan, Mannedorf, Švicarska
- Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- Hladnjak (-75 °C), TT 80 FRYKA, Njemačka
- Digitalna vaga Tehnica ET-1111, Železnik, Slovenija
- Digitalna vaga AX200, Shimadzu Co., Japan
- Neubauer komorica za brojanje stanica, Reichert, NY, SAD
- Laboratorijski pribor (pipete, nastavci za pipete, laboratorijske čaše)

### 3.1.4. Humana stanična linija

Stanična linija korištena u ovom pokusu je MCF-7 iz *American Type Culture Collection* (ATCC) banke stanica. Uspostavljena je iz epitelnih stanica mliječnih žlijezda dojke, izvedenih iz metastatskog stanja adenokarcinoma. Za uzgoj stanica potrebni su kontrolirani uvjeti u inkubatoru sa atmosferom koja se sastoji od 95% zraka i 5% CO<sub>2</sub> te temperatura od 37 °C. Preporučeni medij za uzgoj stanica je ATCC-formuliran Eagle's

Minimum Essential Medium uz dodatak 0,01 mg/ml humanog inzulina i seruma goveđeg fetusa do konačne 10% koncentracije. U ovom radu stanice su uzgajane u DMEM mediju uz dodatak 10% FBS-a. Izgled MCF-7 stanica pod svjetlosnim mikroskopom prikazan je na slici 5.



**Slika 5.** MCF-7 stanice pod svjetlosnim mikroskopom (povećanje 400x).

### 3.1.5. Eutektična otapala

U radu su korištena eutektična otapala prethodno sintetizirana u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF-a, Zagreb.

Tablica 1. Pregled eutektičnih otapala korištenih u radu

Eutektična otapala		
	IME	KRATICA
1.	Kolin klorid:ksilitol	Ch:Xyol
2.	Kolin klorid:sorbitol	Ch:Sol
3.	Limunska kiselina:prolin	Cit:Pro
4.	Limunska kiselina:glukoza	Cit:Glc
5.	Jabučna kiselina:glukoza	Ma:Glc
6.	Beatin:glukoza	B:Glc
7.	Beatin:jabučna kiselina:glukoza	B:Ma:Glc
8.	Beatin:jabučna kiselina:prolin	B:Ma:Pro

### 3.2. Metode

Tijekom rada s kulturama životinjskih stanica potrebno je raditi aseptično te koristiti sterilan laboratorijski pribor kako nebi došlo do kontaminacije stanica. Sav rad s kulturama stanica izvodi se u laminaru, a ruke i radnu površinu prije rada potrebno je prebrisati 70% etanolom.

#### 3.2.1. Uzgoj MCF-7 stanica

MCF-7 stanice čuvane su na  $-70^{\circ}\text{C}$ . Najprije je potrebno odmrznuti ampulu stanica naglim uranjanjem u vodenu kupelj na  $37^{\circ}\text{C}$ . Nakon odmrzavanja stanice se centrifugiraju pri  $1000 \text{ okretaja min}^{-1}$ , 3 minute, da bi se uklonio medij za zamrzavanje te se talog stanica resuspendira u svježem mediju za uzgoj uz dodatak 10 % FBS. Stanice se održavaju u petrijevoj zdjelici, u inkubatoru s reguliranom atmosferom koja sadrži 95% zraka i 5%  $\text{CO}_2$  pri temperaturi od  $37^{\circ}\text{C}$ . Uzgoj se prati inverznim mikroskopom, a stanice je potrebno precjepljivati kada je površina petrijeve zdjelice prekrivena oko 80 %, da stanice ne uđu u stacionarnu fazu rasta zbog kontaktne inhibicije, budući su MCF-7 stanice adherentnog tipa. Stanice su pasażirane otprilike svaka 3-4 dana kako bi se održavale u eksponencijalnoj fazi rasta.

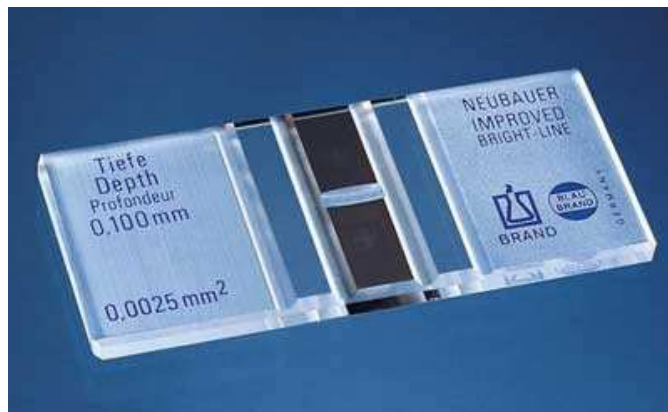
#### 3.2.2. Određivanje broja stanica dodatkom boje tripan-plavo

Za određivanje broja stanica prvo je potrebno ukloniti hranjivi medij te dodati 1 ml tripsina. Petrijevka sa stanicama se zatim vraća u inkubator na oko 5 minuta kako bi se stanice djelovanjem tripsina odvojile od površine. Djelovanje tripsina provjeri se pod inverznim mikroskopom. Stanice pričvršćene za površinu su nepravilnog, romboidnog, izduljenog oblika, a stanice odvojene od površine za rast su pravilnog, kružnog oblika te plutaju u tripsinu. Nakon što su se stanice odvojile, dodaje se 1 ml medija koji sadrži proteaze koje inaktiviraju tripsin da se stanice potpuno ne razgrade. Od tuda se sterilno izuzme alikvot od  $10 \mu\text{l}$  suspenzije stanice kojem se dodaje  $10 \mu\text{l}$  boje tripan-plavo te se dobro promiješa.  $10 \mu\text{l}$  tako pripremljene suspenzije nanese se na Neubauerovu komoricu za brojanje (slika 6). Neubauerova komorica se sastoji od 9 kvadrata (slika 7) površine  $0,0025 \text{ mm}^2$  i dubine  $0,1$

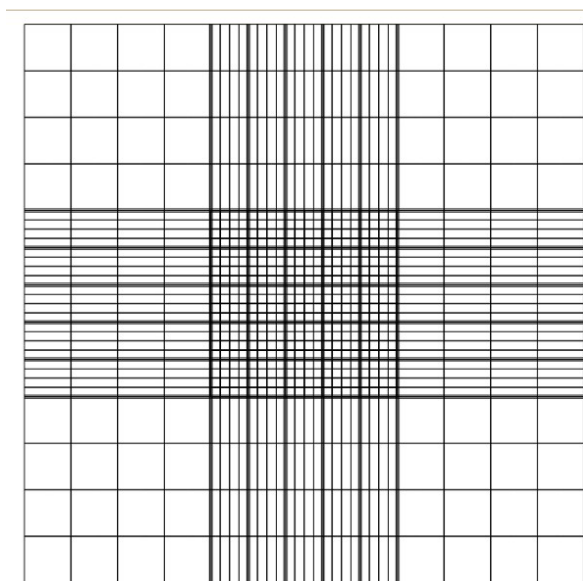


mm. Stanice se broje u 4 kvadrata koji se nalaze na kutevima velikog kvadrata, a podijeljeni su na 16 (4x4) malih kvadrata. Broj stanica u ml suspenzije računa se prema formuli:

$$\text{Broj stanica ml}^{-1} \text{ suspenzije} = \text{broj stanica izbrojenih u sva 4 kvadrata} \times 5000 \quad (1)$$



**Slika 6.** Neubaerova komorica za brojanje stanica



**Slika 7.** Podjela Neubauerove komorice za brojanje stanica

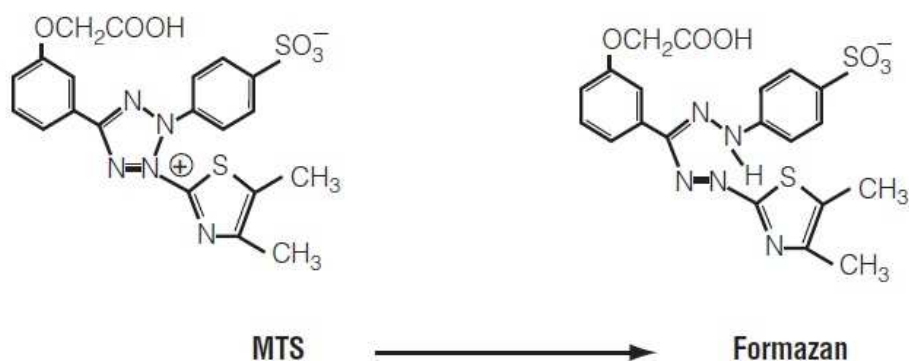
### 3.2.3. Nacjepeljivanje i tretman MCF-7 stanica

Nakon brojanja stanica izračunato je koliko je potrebno suspenzije stanica kako bi priredili dovoljni volumen stanica za postavljanje pokusa s početnom koncentracijom od  $3 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  za nacjepeljivanje ploče sa 96 jažica. U svaku jažicu nacijepljeno je 100  $\mu\text{l}$

suspenzije MCF-7 stanica te je zatim ploča inkubirana na 37 °C narednih 24 sata, koliko je potrebno da se stanice prihvate za površinu i nastave rasti. Nakon prekonoćnog rasta, stanicama je dodano po 10 µl različitih ishodnih otopina eutektičnih otapala Ch:Xyol, Ch:Sol, Cit:Pro, Cit:Glc, Ma:Glc, B:Glc, B:Ma:Glc i B:Ma:Glc pri čemu su nominalne koncentracije u jažicama bile: 500 mg L<sup>-1</sup>, 1000 mg L<sup>-1</sup> i 2000 mg L<sup>-1</sup>. Za svaku koncentraciju postavljene su po četiri paralele, a pokus je ponovljen dva puta. Kontrolnim stanicama dodano je 10 µl sterilne deionizirane vode koja je korištena za pripremu ishodnih otopina DES-ova. Stanice su inkubirane 72 sata te je nakon provedenog tretmana određen učinak eutektičnih otapala na MCF-7 stanice primjenom MTS metode.

### 3.2.4. MTS metoda za određivanje preživljenja stanica

MTS metoda je kolorimetrijska metoda koja se koristi za određivanje broja živih stanica u citotoksičnim i proliferacijskim testovima. Reagens sadrži sol tetrazolija MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij] i reagens za povezivanje elektrona PES (fenazin etosulfat). PES povećava kemijsku stabilnost regensa, što mu omogućava da u kombinaciji na MTS-om formira stabilnu otopinu. Tetrazolijeva sol MTS se reducira djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza u živim stanicama u ljubičasto obojeni produkt formazan, koji je topljiv u staničnom mediju (slika 8). Ta konverzija se vrši u prisutnosti NADH i NADPH koje proizvode dehidrogenaze u metabolički aktivnim stanicama.



**Slika 8.** Redukcija topljivog MTS u formazan

Nakon inkubacije stanica tretiranih eutektičnim otapalima tijekom 72 sata, medij s ispitivanim otapalom je uklonjen te je u svaku jažicu dodano 100  $\mu$ l svježeg medija s MTS reagensom (10% v/v). Ploča je potom vraćena u inkubator i inkubirana sljedeća 1-4 sata. Intenzitet razvijene boje određuje se spektrofotometrijski primjenom čitača ploča pri valnoj duljini od 490 nm u odnosu na slijepu probu. Količina izmjerene formazane direktno je proporcionalna broju živih stanica u kulturi. Dobiveni rezultat izražen je kao postotak preživljenja tretiranih stanica u odnosu na netretirane, kontrolne stanice prema izrazu:

$$\text{Preživljenje (\%)} = (\text{Apsorbancija tretiranih stanica}) / (\text{Apsorbancija kontrolnih stanica}) \times 100 \% \quad (2)$$

### 3.2.5. Bojanje stanica otopinom boje kristal-ljubičasto

Kako bi smo lakše uočili i fotografirali promjene u izgledu MCF-7 stanica tijekom tretmana ispitivanim eutektičnim otapalima stanice su nacijeppljene u ploču sa 6 jažica. Nacijeppljeno je 2 mL suspenzije stanica koncentracije  $3 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  i tretirano, kako je prethodno opisano u poglavlju 3.2.3. s 200  $\mu$ l odabranih eutektičnih otapala Cit:Glu, Ma:Glu i B:Glu. Nakon 72 sata tretmana uklonjen je medij za uzgoj te su stanice isprane dodatkom 2 mL PBS pufera, a zatim je dodano 0,5 mL otopine boje kristal-ljubičasto. Ploča je vraćena u inkubator na 20-tak min do pola sata, nakon čega je uklonjena boja, stanice su isprane PBS puferom te slikane Dyno-Eye kamerom pod inverznim svjetlosnim mikroskopom.

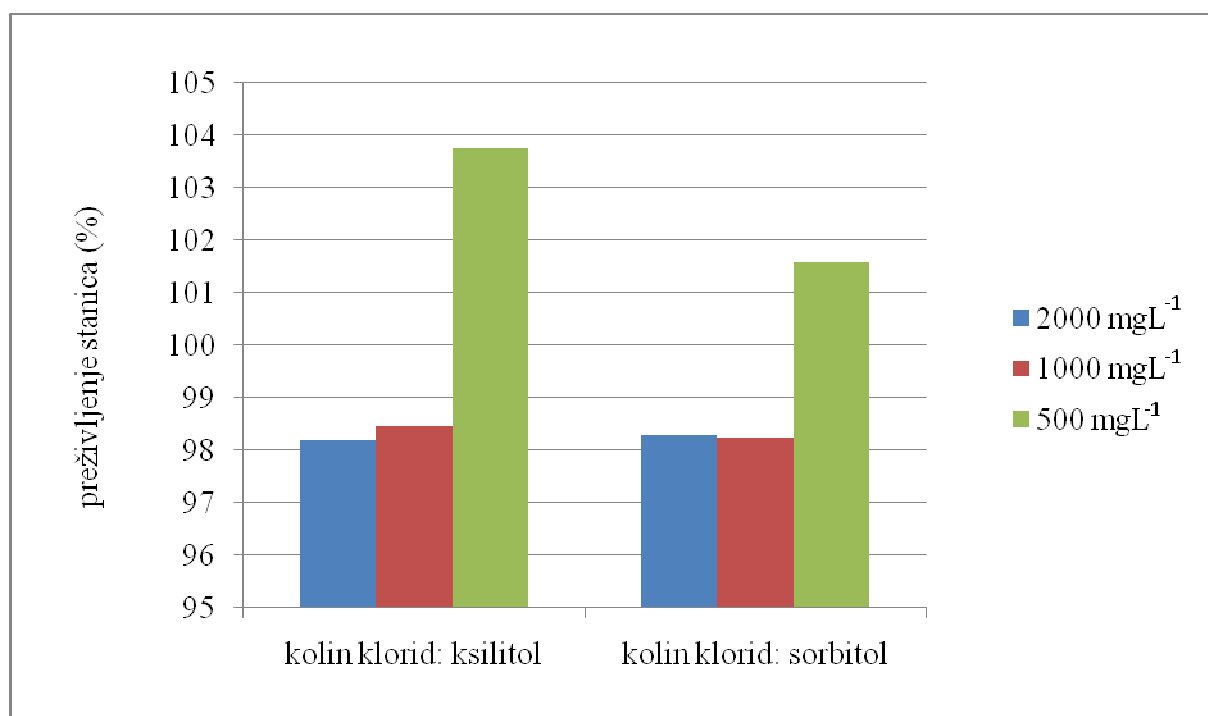
## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Utjecaj eutektičnih otapala na MCF-7 staničnu liniju

U ovom radu ispitano je djelovanje osam eutektičnih otapala, prethodno sintetiziranih u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, na MCF-7 staničnu liniju. Za potrebe eksperimenta MCF-7 stanice su naciepljene u ploče s 96 jažica u koncentraciji  $3 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  u 100  $\mu\text{L}$  medija za uzgoj. Nakon 24 h od naciepljivanja stanice su tretirane različitim masenim koncentracijama otapala pri čemu je koncentracija u jažici iznosila: 500  $\text{mg L}^{-1}$ , 1000  $\text{mg L}^{-1}$  i 2000  $\text{mg L}^{-1}$  eutektičnog otapala. Citotoksični učinak eutektičnih otapala određen je 72 h nakon tretmana primjenom MTS metode, kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.

##### 4.1.1. Učinak eutektičnih otapala baziranih na kolin kloridu kao kationu

Jedan od najčešćih sastojaka eutektičnih otapala je kolin klorid. U ovom radu su ispitana dva eutektična otapala koja sadrže kolin klorid, Ch:Xylol i Ch:Sol. Učinak različitih koncentracija navedenih otapala prikazan je na slici 9.

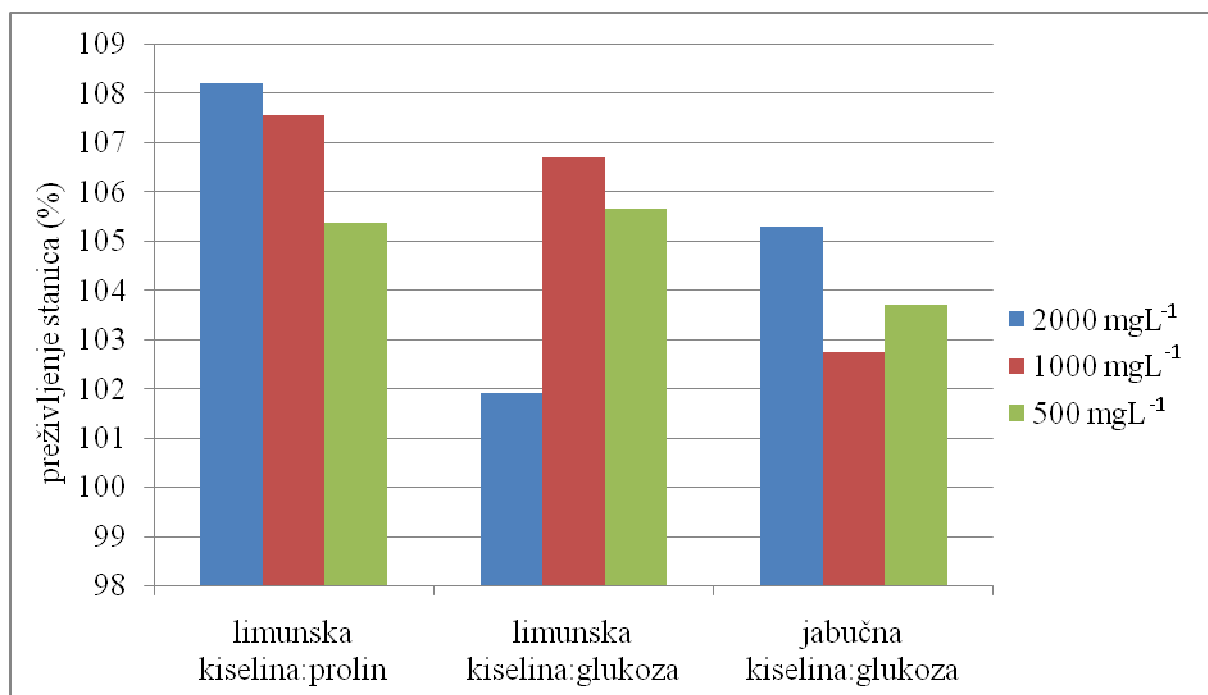


**Slika 9.** Učinak eutektičnih otapala kolin klorid:ksilitol i kolin-klorid:sorbitol, u različitim koncentracijama, na rast MCF-7 stanica

Iz rezultata prikazanih na slici 9. vidljivo je da eutektična otapala bazirana na kolin kloridu kao kationu ne djeluju toksično na MCF-7 stanice, te da ni pri najvećoj ispitanoj masenoj koncentraciji ( $2000 \text{ mg L}^{-1}$ ) nije zapažena inhibicija rasta stanica.

#### 4.1.2. Učinak eutektičnih otapala s organskim kiselinama kao HDB-ima

Učinak eutektičnih otapala s organskim kiselinama kao HDB-ima, jabučnom i limunskom kiselinom, u kombinaciji s neesencijalnom aminokiselinom prolinom te glukozom, ispitan je na MCF-7 staničnoj liniji kao što je prethodno opisano. Nakon dodatka Cit:Pro, Cit:Glc i Ma:Glc u medij za uzgoj stanica uočena je promjena boje medija, iz roze u narančastu, koja je bila izraženija pri većoj koncentraciji eutektičnog otapala, što ukazuje na blagu promjenu pH medija za uzgoj stanica. Učinak različitih koncentracija navedenih otapala prikazan je na slici 10.



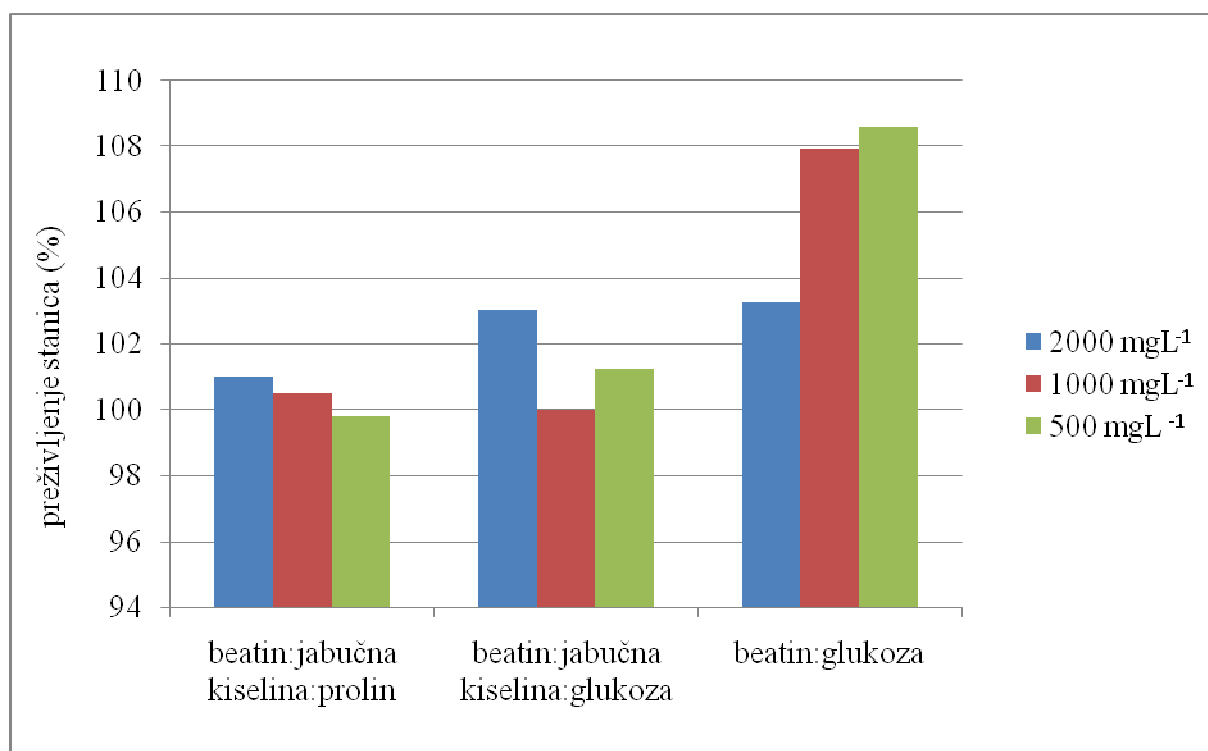
**Slika 10.** Učinak eutektičnih otapala limunska kiselina:prolin, limunska kiselina:glukoza i jabučna kiselina:glukoza u različitim koncentracijama, na MCF-7 staničnu liniju.

Iz rezultata prikazanih na slici 10. vidljivo je da eutektična otapala bazirana na organskim kiselinama kao HDB-ima nemaju negativan učinak na rast MCF-7 stanica.

Također, uočena blaga promjena pH medija, kao posljedica dodatka kiselih DES-ova, nije bila nepovoljna za rast stanica.

#### 4.1.3. Učinak eutektičnih otapala koja sadrže beatin

U radu su ispitana i tri eutektična otapala koja sadrže beatin, B:Glc, B:Ma:Glc i B:Ma:Pro. Učinak tih eutektičnih otapala prikazan je na slici 11.

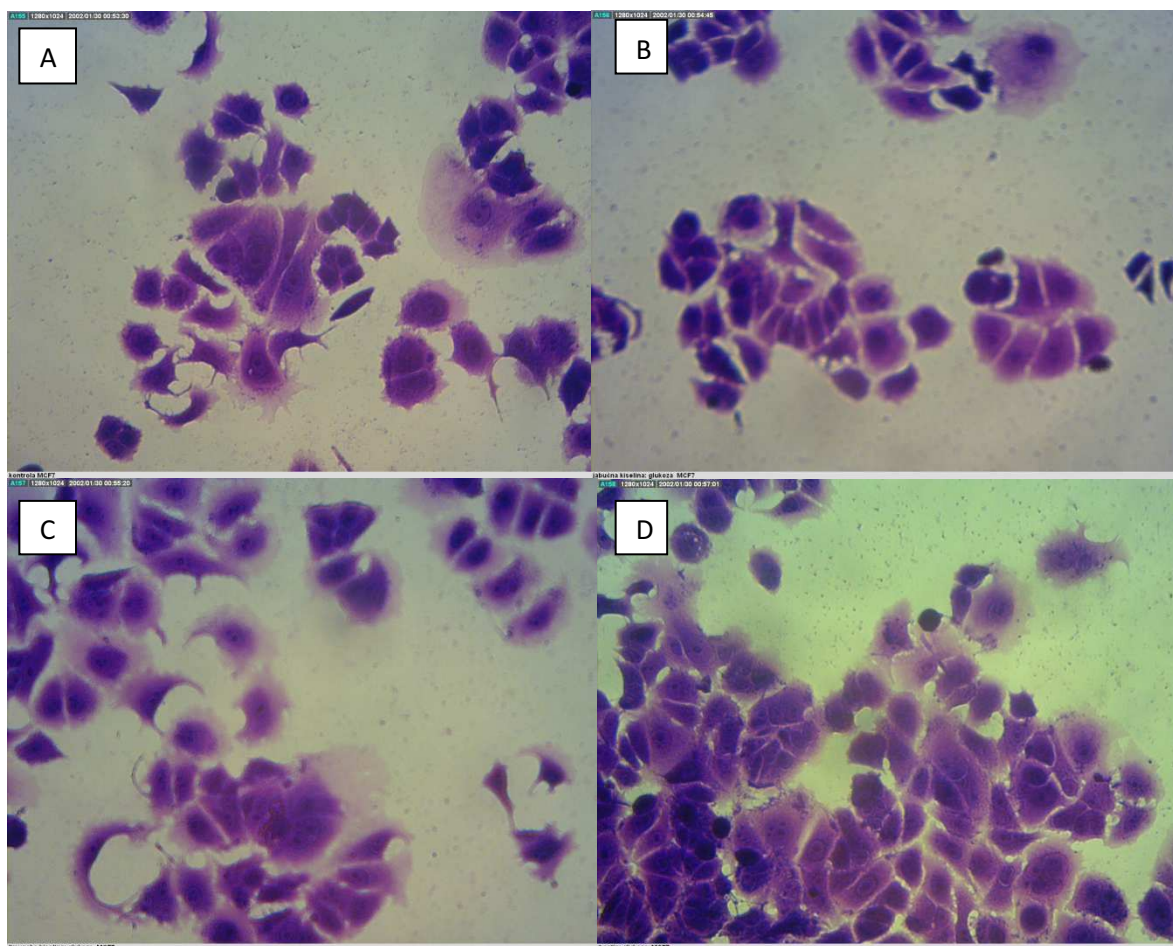


**Slika 11.** Učinak eutektičnih otapala beatin:jabučna kiselina:prolin, beatin:jabučna kiselina:glukoza i beatin:glukoza, u različitim koncentracijama, na rast MCF-7 stanica.

Kao što je vidljivo iz rezultata pokusa, ispitana eutektična otapala ne inhibiraju rast stanica. Kao i kod Cit:Glc i Ma:Glc (slika 10), vidljiv je blagi pozitivni učinak na rast stanica tretiranih eutektičnim otapalima koja sadrže glukozu.

#### 4.2. Morfologija MCF-7 stanica tretiranih eutektičnim otapalima

Uz ispitivanje djelovanja eutektičnih otapala na rast i preživljenje MCF-7 stanica promatran je izgled i brojnost MCF-7 stanica bojanjem stanica kristal-ljubičastim. Stanice slikane pod svjetlosnim inverznim mikroskopom prikazane su na slici 12 (A-D).



**Slika 12.** Stanice bojane kristal-ljubičastim slikane pod inverznim svjetlosnim mikroskopom (povećanje 400x) : kontrolne stanice (A), jabučna kiselina:glukoza (B), limunska kiselina:glukoza (C) i beatin:glukoza (D). Stanice su tretirane najvećom ispitivanom koncentracijom DES-a ( $2000 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Izgledom i morfologijom se MCF-7 stanice tretirane eutektičnim otapalima (12 B-D) ne razlikuju od kontrolnih stanica (12A) odnosno ispitana eutektična otapala ne utječu na morfologiju stanica.



## **5. RASPRAVA**

Zelena otapala su nesumnjivo razred kemikalija koji se u zadnjih nekoliko desetljeća uvelike razvio. Svaka grupa novo razvijenih alternativnih otapala ima velike prednosti pred organskim otapalima i u većini je slučajeva u skladu sa zahtjevima zelene kemije. Trenutačna znanja o prirodnim ionskim kapljevinama i eutektičnim otapalima ukazuju na to da se te smjese ne smiju smatrati ne toksičnim prije odgovarajuće toksikološke provjere (Radošević i sur., 2016). Toksičnost kemikalija prisutnih u okolišu i novosintetiziranih kemikalija ispituje se *in vivo* i *in vitro*. Pravilnik EU temeljen na REACH (eng. *Registration, Evaluation and Authorization of Chemical Substances*) pravilniku naglašava upotrebu *in vitro* testova kao alternative *in vivo* testovima na pokusnim životinjama sa ciljem smanjenja broja laboratorijskih životinja potrebnih za ispitivanja. Testovi obuhvaćaju postupke u kojima se koriste stanične kulture, stanične linije, kulture organa i dijelovi tkiva, a omogućuju istraživanja molekularnih, staničnih i fizioloških mehanizama toksičnosti izazvanih različitim kemikalijama (Kniewald i sur., 2005) te toksikokinetičko modeliranje i određivanje odnosa između aktivnosti i strukture ispitivane tvari. Citotoksičnost kemikalija može se odrediti na različite načine uključujući mjerenje stanične smrti, preživljenja i funkcionalnosti stanica te promatranjem morfologije, prihvatanja i proliferacije stanica (Radošević i sur., 2013).

U ovom radu ispitana je toksičnost osam eutektičnih otapala na MCF-7 humanoj staničnoj liniji. MCF-7 stanice uzgajane su u T-bocama i održavane u eksponencijalnoj fazi rasta te naciepljene u ploče s 96 jažica. Nakon 24 sata, kada su se stanice prihvatile na površinu za uzgoj, one su tretirane eutektičnim otapalima u koncentracijama 500 mg L<sup>-1</sup>, 1000 mg L<sup>-1</sup> i 2000 mg L<sup>-1</sup>. Ispitan je učinak eutektičnih otapala kolin klorid:ksilitol, kolin klorid:sorbitol, limunska kiselina:prolin, limunska kiselina:glukoza, jabučna kiselina:glukoza, beatin:glukoza, beatin:jabučna kiselina:glukoza i beatin:jabučna kiselina:prolin, prethodno sintetiziranih u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF-a. Nakon 72 sata tretmana određeno je preživljenje MCF-7 stanica u odnosu na kontrolne stanice primjenom MTS metode.

Učinak eutektičnih otapala koja sadrže kolin klorid u kombinaciji s šećernim alkoholima ksilitolom i sorbitolom na rast MCF-7 stanica je neznatan (slika 9). Preživljenje stanica tretiranih otapalima u najvećoj ispitanoj koncentraciji (2000 mg L<sup>-1</sup>) veće je od 98 %. Dobiveni rezultati odgovaraju rezultatima objavljenim u istraživanju Radošević i sur. (2015), gdje je pri ispitivanju *in vitro* toksičnosti na CCO i MCF-7 staničnim linijama kolin klorid: glicerol pokazao nisku citotoksičnost. Utjecaj sedam eutektičnih otapala također baziranih na

kolin kloridu te šećerima i organskim kiselinama kao HDB u koncentracijama 1-2000 mg L<sup>-1</sup> na CCO staničnu liniju ispitan je u radu Radošević i sur. (2016). Najjači negativan efekt na rast stanica 72 sata nakon tretmana eutektičnim otapalima izazvan je tretmanom kolin klorid:jabučna kiselina bila je inhibicije rasta od 27%. Niti jedan od testiranih eutektičnih otapala nije izazvao 50% inhibiciju niti pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji pa je EC<sub>50</sub> vrijednost procijenjenja na više od 2000 mg L<sup>-1</sup>. Neznatna razlika u preživljenju stanica između stanica tretiranih kolin kloridom: jabučnom kiselinom u različitim molarnim omjerima pokazuje da molarni omjer komponenata DES-ova utječe na toksikološki profil otapala. Utjecaj molarnih omjera primijećen je i u radovima Hayyan i sur. (2015), Wen i sur. (2015) i Ventura i sur. (2014) koji su zaključili da toksičnost kolinijevih soli ovisi o anionu.

Tretman stanica eutektičnim otapalima koja se baziraju na organskim kiselinama kao HDB u kombinaciji sa glukozom odnosno prolinom kao HDA (slika 10) nema negativan učinak na rast MCF-7 stanica. Preživljenje stanica ni pri najvećim koncentracijama nije manje od 100%. Povećanjem koncentracije eutektičnog otapala limunska kiselina:prolin blago raste i preživljenje stanica pa možemo zaključiti da eutektično otapalo pozitivno djeluje na rast stanica. Sličan utjecaj ima i eutektično otapalo jabučna kiselina:glukoza. Tijekom tretmana eutektičnim otapalima koja se baziraju na organskim kiselinama kao HDB došlo je do promjene pH medija koja je bila vidljiva u promjeni boje medija iz ružičaste u narančastu. Eutektično otapalo kolin klorid:oksalna kiselina pokazalo je umjerenu toksičnost prema CCO stanicama (Radošević i sur., 2015) što ukazuje da to eutektično otapalo ima lošiji ekotoksikološki profil upravo zbog prisutnosti organske kiseline u njihovoj smjesi, no takav rezultat nije zapažen u ovom radu. Usporedbom rezultata za jabučna kiselina:glukoza u ovom radu s već spomenutim djelovanjem kolin klorid:jabučna kiselina na CCO stanice gdje je izmjerena inhibicija rasta od 27% (Radošević i sur., 2016) te rad Paiva i sur. (2014) koji je ispitao citotoksičnost 11 različitih DES-ova, pri čemu ChCl-bazirani DES-ovi s vinskom i limunskom kiselinom bili najpogubniji za preživljenje L929 stanica, možemo zaključiti da i anionski dio pridonosi ukupnom ekotoksikološkom profilu eutektičnih otapala.

Učinak eutektičnih otapala koja sadrže beatin (slika 11) također nije bio nepovoljan za rast MCF-7 stanica. Preživljenje stanica veće je od 98 %, odnosno možemo reći isti kao kod kontrolnih, netretiranih stanica. Na temelju eksperimentalnih podataka za citotoksičnost svih osam ispitanih eutektičnih otapala EC<sub>50</sub> vrijednost nije bilo moguće izračunati, jer ni pri najvećoj koncentraciji od 2000 mg L<sup>-1</sup> nije došlo do značajnije inhibicije rasta MCF-7 stanica.

Iz toga možemo zaključiti da su  $EC_{50}$  vrijednosti za sva eutektična otapala ispitana u ovom radu veće od  $2000 \text{ mg L}^{-1}$ , odnosno da prema UFT Merck ILs Biological Effects Database (<http://www.il-eco.uft.uni-bremen.de>) ispitani DES-ovi posjeduju nisku citotoksičnost.

Osim određivanja citotoksičnosti primjenom kolorimetrijske MTS metode, izgled MCF-7 stanica nakon tretmana eutektičnim otapalima promatran je i slika pod svjetlosnim inverznim mikroskopom nakon bojanja otopinom boje kristal-ljubičasto (slika 12). Morfologija tretiranih MCF-7 stanica ne razlikuje se od izgleda kontrolnih, netretiranih stanica što je u skladu sa rezultatima citotoksičnosti za navedena otapala.

Ovim radom je potvrđeno da su eutektična otapala uistinu obećavajuća alternativa organskim otapalima s dobrim „zelenim“ osobinama te da ciljani odabir sastavnih komponenata DES-ova može rezultirati još boljim ekotoksikološkim profilom uz istovremeno očuvanje ili čak poboljšanje željenih fizikalno-kemijskih svojstva otapala, ovisno o planiranoj primjeni DES-a.

## **6. ZAKLJUČCI**

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. MTS metodom utvrđeno je da ispitana eutektična otapala, kolin klorid:ksilitol, kolin klorid:sorbitol, limunska kiselina:prolin, limunska kiselina:glukoza, jabučna kiselina:glukoza, beatin:glukoza, beatin:jabučna kiselina:glukoza i beatin:jabučna kiselina:prolin, u koncentracijama do  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  nemaju citotoksičan učinak na MCF-7 humanu staničnu liniju.
2. Bojanjem stanica otopinom kristal-ljubičasto pokazano je da ispitana eutektična otapala u koncentracijama do  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  ne utječu na promjene u izgledu tretiranih u odnosu na kontrolne MCF-7 stanice.
3.  $\text{EC}_{50}$  vrijednost ispitanih eutektičnih otapala veća je od  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  stoga ispitani DES-ovi posjeduju nisku citotoksičnost.

## **7. LITERATURA**

- Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K. (2004) Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9142–9147.
- Abbott, A.P., Capper, G., Gray, S. (2006) Design of improved deep eutectic solvents using hole theory. *Chem. Phys. Chem.* **7**, 803–806.
- Abbott, A.P., Capper, G., McKenzie, K.J., Ryder, K.S. (2007) Electrodeposition of zinc–tin alloys from deep eutectic solvents based on choline chloride. *J Electroanal. Chem.* **599**, 288–294.
- Anastas, P.T., Warner, J.C. (1998) *Green Chemistry : Theory and Practice*, Oxford University Press, New York.
- Anastas, P.T., Eghbali, N. (2010) Green chemistry : principles and practice. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 301–312.
- Bucheli, T.D., Fent, K. (1996) Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Envir. Sci. Tech.* **25**, 201–268.
- Cairns, J.Jr. (1986) The myth of the most sensitive species. *Bioscience* **36**, 670-672.
- Cairns, J.Jr. i Niederlehner, B. R. (1987) Problems associated with selecting the most sensitive species for toxicity testing. *Hydrobiologia* **153**, 87-94.
- Castaño, A., Bols, N., Braunbeck, T., Dierickx, P., Halder, M., Isomaa, B., Kawahara, K., Lee, L-E.J., Mothersill, P., Pärt, P., Repetto, G., Sintes, J.R., Rufli, H., Smith, R., Wood, C., Segner, H. (2003) The use of fish cell in ecotoxicology. *ATLA* **31**, 317–351.
- Carriazo, D., Serrano, M. C., Gutierrez, M. C., Ferrer, M. L., del Monte, F. (2012) Deep-eutectic solvents playing multiple roles in the synthesis of polymers and related materials. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 4996–5014.
- Chapman, G. A. (1981) Do organisms in laboratory toxicity tests respond like organisms in nature? In *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Sixth Symposium*. Edited by N. E. Bishop, R. D. Cardwell and B. B. Heidolph. 315-327. ASTM, Philadelphia.



- Cvjetko Bubalo, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I., Halambek, J., Gaurina Srček, V. (2014) A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **99**, 1–12.
- Dai, Y. T., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013) Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *Carthamus tinctorius* L. *Anal. Chem.* **85**, 6272–6278.
- Davey, R. J., Garside, J., Hilton, A. M., Mcewan, D., Morrison, J. W. (1995) Purification of molecular mixtures below the eutectic by emulsion crystallization. *Nature* **375**, 664–666.
- del Monte, F., D. Carriazo, M.C. Serrano, M.C. Gutierrez, and M.L. Ferrer (2014) Deep Eutectic Solvents in Polymerizations: A Greener Alternative to Conventional Syntheses. *Chem. Sus. Chem.* **7**, 999-1009.
- Dominguez de Maria, P., Maugeri, Z. (2011) Ionic liquids in biotransformations: from proof-of-concept to emerging deep-eutectic-solvent. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 220–225.
- Drylie, E. A., Wragg, D. S., Parnham, E. R., Wheatley, P. S., Slawin, A. M. Z., Warren, J. E., Morris, R. E. (2007) Ionothermal synthesis of unusual choline-templated cobalt aluminophosphates. *Angew. Chem., Int. Ed.* **46**, 7839–7843.
- Ekwall, B. (1995) The basal cytotoxicity concept. U: Alternative Methods in Toxicology and the Life Sciences, (Goldberg, A., van Zutphen, L., ured.), The World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences: Education, Researches, Testing, 11. Mary Ann Libert, New York, 721-725
- Fent, K. (1996) Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit. Rev. Tox.* **26**, 1–117.
- Fent, K. (2001) Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assesement of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and enviromental samples. *Toxicol. in Vitro* **15**, 477-488.
- Fent, K., Hunn, J. (1996) Cytotoxicity of organic environmental chemicals to fish liver cells (PLHC-1). *Marine Envir. Res.* **42**, 377–382.
- Fent, K. (1998) Oekotoxikologie (Thieme-Verlag). Stuttgart

- Fent, K. (2007) Permanent fish cell cultures as important tools in ecotoxicology. *ALTEX* **24**, *Special issue*, 26-28.
- Francisco, M., van den Bruinhorst, A., Kroon, M.C. (2013) Low-transition temperature mixtures (LTTMs): a new generation of designer solvents. *Angew Chem.* **52**,3074–3085.
- Gałaszka, A., Migaszewski, Z., Namieśnik, J. (2013) The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practice. *Trends. Anal. Chem.* **50**,78–84.
- Gill, I., Vulfson, E. (1994) Enzymatic catalysis in heterogeneous eutectic mixtures of substrates. *Trends Biotechnol.* **12**, 118–122.
- Haerens, K., Matthijs, E., Chmielarz, A., Van der Bruggen, B. (2009) The use of ionic liquids based on choline chloride for metal deposition: A green alternative? *J. Environ. Manage.* **90**, 3245–3252.
- Hayyan, M., Hashim, M.A., Hayyan, A., Al-Saadi, M.A., Alnashef, I.M., Mirghani, M.E., Saheed, O.K. (2013a) Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere* **90**, 2193–2195.
- Hayyan, M., Hashim, M.A., Al-Saadi, M.A., Hayyan, A., Alnashef, I.M., Mirghani, M.E., (2013b) Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere* **93**, 455–459.
- Hayyan, M., Looi, C.Y., Hayyan, A., Wong, W.F., Hashim, M.A. (2015) In vitro and in vivo toxicity profiling of ammonium-based deep eutectic solvents. *PloS One* **10**, e0117934.
- Isomaa, B., Lillius H (1995), The Urgent Need for *In Vitro* Tests in Ecotoxicology. *Toxicol. in Vitro* **9**, 821-825.
- Kniewald, J., Kmetić, I., Gaurina Srček, V., Kniewald, Z. (2005) Alternative models for toxicity testing and xenobiotics. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **56**, 195-204.
- Kudlak, B., Owczarek, K., Namieśnik, J. (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents-a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 11975-11992.

Liu, L., Wragg, D. S., Zhang, H. Y., Kong, Y., Byrne, P. J., Prior, T. J., Warren, J. E., Lin, Z. J., Dong, J. X., Morris, R. E. (2009) Ionothermal synthesis, structure and characterization of three-dimensional zinc phosphates. *Dalt. Trans.* 6715–6718.

Morrison, H. G., Sun, C. C., Neervannan, S. (2009) Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles. *Int. J. Pharm.* **378**, 136–139.

Nkuku, C. A. i LeSuer, R. J. (2007) Electrochemistry in deep eutectic solvents. *Phys. Chem. B.* **111**, 13271–13277. Lopezfandino, R., Gill, I., Vulfson, E. N. (1994) Protease-catalyzed synthesis of oligopeptides in heterogenous substrate mixtures. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 1024–1030.

Paiva, A, Craveiro, R, Aroso, I, Martins, M, Reis, RL, Duarte, ARC. (2014) Natural deep eutectic solvents—solvents for the 21st century. *Sustainable Chem. Eng.* **2**, 1063–1071.

Petkovic, M., Seddon, K. R., Rebelo, L. P., Silva Pereira, C. (2011) Ionic liquids : a pathway to environmental acceptability. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 1383–1403.

Radošević, K., Cvjetko, M., Kopjar, N., Novak, R., Dumić, J., Gaurina Srček, V. (2013) In vitro cytotoxicity assessment of imidazolium ionic liquids: Biologicaleffects in fish Channel Catfish Ovary (CCO) cell line. *Ecotoxicol. Environ. Saf* **92**, 112-118.

Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Grgas, D., Landeka Dragičević, T., Radojčić Redovniković, I. (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **112**, 46-53.

Radošević, K., Železnjak, J., Cvjetko Bubalo, M., Radojčić Redovniković, I., Slivac, I., Gaurina Srček, V. (2016) Comparative in vitro study of cholinum-based ionic liquids and deep eutectic solvents towards fish cell line. *Ecotoxicol. Environ. Saf* **131**, 30-36.

Ruß, C. i König, B. (2012) Low melting mixtures in organic synthesis - An alternative to ionic liquids? *Green Chem.* **14** (11), 2969-2982.

Segner, H. (2004) Cytotoxicity assay with fish cells as an alternative to the acute lethality assay with fish. *ATLA* **32**, 375–382.

- Singh, B.S., Lobo, H.R., Pinjari, D.V., Jarag, K.J., Pandit, A.B., Shankarling, G.S. (2013) Ultrasound and deep eutectic solvent (DES): a novel blend of techniques for rapid and energy efficient synthesis of oxazoles. *Ultrason. Sonochem.* **20**, 287–293.
- Stott, P. W., Williams, C., Barry, B. W. (1998) Transdermal delivery from eutectic systems: Enhanced permeation of a model drug, ibuprofen. *J. Controlled Release* **50**, 297–308.
- Tanneberger, K. (2010) Assessment of chemicals: fish cells as an alternative to whole fish. *Eawag. News* **68**, 25–27.
- UFT Merck ILs Biological Effects Database <http://www.il-eco.uft.uni-bremen.de> (pristupljeno 22.6.2016)
- Ventura, S.P.M., Silva, F.A., Gonçalves, A.M.M., Pereira, J.L., Gonçalves, F., Coutinho, J.A.P. (2014) Ecotoxicity analysis of cholinium-based ionic liquids to *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* **102**, 48–54.
- Weiss, J. S. (1985) Letters to the Editor: Species in ecosystems. *Biosci.* **35**, 330.
- Wen, Q., Chen, J.-X., Tang, Y.-L., Wang, J., Yang, Z. (2015) Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents. *Chemosphere* **132**, 63–69.
- Zdanowicz, M., Tadeusz, S. (2011) Ionic liquids as starch plasticizers or solvents. *Polimery* **56**, 861–864.
- Zhang, Q.H., Vigier, K.D.O., Royer, S., Jerome, F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 7108–7146.
- Zhao, H., Zhang, C., Crittle, T. D. (2013) Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **85–86**, 243–247.